

子宮頸部扁平上皮癌より新しい型のヒトパピローマウイルス-HPV52bのクローニング, およびその生物学的活性

著者	矢嶋 元
号	2048
発行年	1989
URL	http://hdl.handle.net/10097/20249

氏 名（本籍）	矢 嶋 元
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	医 第 2048 号
学位授与年月日	平 成 元 年 2 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最 終 学 歴	昭 和 57 年 3 月 東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目	Isolation of a new type of human papilloma-virus (HPV52b) with a transforming activity from cervical cancer tissue. (子宮頸部扁平上皮癌より新しい型のヒトパピローマウイルス—HPV52bのクローニング, およびその生物学的活性)
-------------	---

	(主 査)
論 文 審 査 委 員	教授 矢 嶋 聰 教授 菅 村 和 夫 教授 帯 刀 益 夫

論文内容要旨

近年、ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus-HPV) のうち、いくつかの型 (type) がヒト子宮頸癌の発生に関与していることが示唆されている。HPVは現在までに50数種が知られているが、HPVの各型は、抗原となるウイルス粒子産生が少量または認められないことや、ウイルスを産生する培養細胞系がないことから血清学的診断によらず、DNA間のcross-hybridizationの割合により決められている。即ち50%以下のcross-hybridizationを示すHPVは各々独立したHPV型 (type) とし、50%以上のcross-hybridizationを示し制限酵素地図が異なるものをサブタイプ (subtype) としてa, b, c……で表している。このうち子宮頸癌の発生に関与すると考えられ、最も解析の進んでいるHPV16・18型遺伝子は、欧米において子宮頸癌症例の約60%以上で検出される。また、HPV16・18型以外のまだ未知のHPV遺伝子を含めると、HPV遺伝子は子宮頸癌症例の約90%で検出されている。日本での子宮頸癌症例におけるHPV16・18型遺伝子の検出頻度は約30%とされ、一般にHPVの分布には地域的な相違があると考えられている。今回、子宮頸部扁平上皮癌組織より、新しいヒトパピローマウイルス-HPV52bのクローニングに成功し、子宮頸癌症例中におけるHPV52bの検出頻度、細胞内における存在様式、生物学的活性を解析した。1) クローニング 大阪地区で得られた子宮頸部扁平上皮癌組織4例よりDNAを抽出し、HPV6・11・16・18型遺伝子をプローブに用い、stringentな条件でSouthern blot hybridizationを行った。4例中1例でHPV16型が検出された。ついでHPV16型遺伝子をプローブに用い、類似の遺伝子を検出することのできるnon-stringentな条件でSouthern blot hybridizationを行ったところ、4例中2例にHPV6・11・16・18型とは異なる型のHPV遺伝子を検出した。この2例より抽出したDNAを種々の制限酵素で消化し、その消化パターンを、今までに子宮頸癌よりクローニングされているHPV遺伝子と比較したところ、2例に存在するHPV遺伝子は同じ型で、かつ新しい型のHPV遺伝子と考えられた。このため、cosmid vectorの一種であるcharomid vectorを用い、2例中1例のDNAよりgenomic DNA library を作製し、HPV16型遺伝子をプローブとして、このHPV遺伝子をクローニングした。クローニングしたHPV (以下HPV-MKと称す) の制限酵素地図、及びHPV6・11・16・18型遺伝子とのhybridization signalの比較により、HPV-MKはいままで制限酵素地図が知られているHPVとは異なっており、HPV6・11・16・18型遺伝子の中ではHPV16型とhomologyが高いことがわかった。HPV-MKが今までにクローニングされているHPVとは別の新しい型であることを最終的に確認するため、HPV-MK遺伝子を、HPVのDNA library を所有し、HPVの命名を行う照合センターであるReference Center for

Human Pathogenic PapillomavirusのE. M. de Villiers に送った。E. M. de Villiersにより全てのHPV遺伝子(51種)との異同がhybridizationにより検討され、この結果HPV-MK遺伝子は新しい型であることが判明し、現在までにクローニングされているHPV遺伝子のうちではHPV33型遺伝子と最も高いhomologyを有していた。さらにHPV-MK遺伝子のクローニングの数カ月前にアメリカのLancasterによりクローニングされたHPV遺伝子がHPV-MK遺伝子と同一ではないものの極めて高いhomologyを有していることも明らかとなり、HPV-MKは正式にHPV52bと命名された。

2) 子宮頸癌症例での検出頻度 大阪地区における子宮頸癌症例15例中、HPV52b型遺伝子は3例(20%)に存在した。また、HPV52b型遺伝子とは異なる型でありながら、HPV52b型遺伝子と近縁と考えられるまだ未知のHPV遺伝子が15例中3例(20%)に検出された。HPV16型遺伝子は3例(20%)に検出された。これより、大阪地区においては、欧米に比較してHPV16型遺伝子の検出頻度は低く、HPV52b及びHPV52bと近縁と思われるHPV遺伝子が多く(15例中6例:40%)分布している可能性が示唆された。

3) 細胞内における存在様式 HPV52b型遺伝子が検出される腫瘍より抽出したDNAを2次元アガロース電気泳動を行い、Southern blot hybridizationで解析した。細胞内でHPV52b型遺伝子はエピゾームの状態で存在しており、HPV16型の場合、integrationしているのとは対照的であった。

4) 生物学的活性 HPV52b型遺伝子をラット及びマウス由来正常繊維芽細胞であるNIH 3T3, 3Y1細胞に導入した。HPV52b型遺伝子には3Y1細胞の飽和密度を上昇させ、NIH 3T3細胞にフォーカスを形成させる作用が認められた。この形質転換作用は、HPV16型遺伝子に認められた作用と全く同質であり、HPV52b型遺伝子がHPV16型遺伝子と同様に子宮頸癌の発生に関与していることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

ヒト子宮頸癌の発生に、ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus : HPV) が関与していることが明らかになりつつある。以前より子宮頸癌は、性行為感染症との関連が疫学的に指摘されており、近年、HPVが注目されるようになった。HPVの子宮病変部での同定は困難であったが、分子生物学的手法を用い組織DNAより遺伝子をクローニングできるようになり、子宮頸癌組織よりHPV16・18型遺伝子がクローニングされた。HPV16・18型遺伝子はヒト子宮頸癌の発生にかかわることが臨床的、実験的に明らかになりつつある。また、これらのクローニングされたHPV遺伝子をプローブに用い、現在までに子宮頸癌組織よりHPV16・18型の他にHPV31・33・35型がクローニングされている。

本研究では、子宮頸部扁平上皮癌組織より、いままでにクローニングされたHPVとは全く異なる新しい型のヒトパピローマウイルス—HPV52b—のクローニングを行い、さらにHPV52b型遺伝子の子宮頸癌症例における検出頻度、細胞内における存在様式、生物学的活性を明らかにしている。

第一に、HPV52b型遺伝子のクローニングである。今までにクローニングされているHPVとは異なる型と思われるHPV遺伝子を子宮頸癌組織2例に認めた。このうち1例よりgenomic DNA libraryを作製し、HPV16型遺伝子をプローブとして新しい型と思われるHPV遺伝子をクローニングした。クローニングしたHPV遺伝子は、HPVの命名を行う照合センターであるReference Center for Human Pathogenic Papillomavirusに送られ、他の型のHPVと照合された。その結果、新しい型であることが判明し、正式にHPV52bと命名された。第二に子宮頸癌症例でのHPV52b型遺伝子の検出頻度を示している。HPV52b型遺伝子は15例中3例(20%)に存在していた。また、HPV52bと近縁と考えられるが、まだ未知のHPVが15例中3例(20%)に検出され、日本においてHPV52b型及びHPV52bと近縁と思われるHPVが多く(15例中6例: 40%)分布している可能性を示唆している。第三に細胞内において、HPV52b型遺伝子がエピソードの状態で存在していることを示している。今までに解析が最も進んでいるHPV16型遺伝子がintegrationしていることと対照的な結果を得ている。第四として、培養細胞系にHPV52b型遺伝子を導入し、HPV52b型遺伝子の生物学的活性を解明している。HPV52b型遺伝子はHPV16型遺伝子と同様に、培養細胞の飽和密度を上昇させ、フォーカスを形成させた。このことより、HPV52b型遺伝子は、HPV16型遺伝子と同様に子宮頸癌の発生に関与していることが示唆された。

以上、本論文は子宮頸癌の発生に関与すると考えられる新しいウイルスをクローニングし、その性質を明らかにしており、学位論文に十分値するものである。